

A study of Immune Response in *Cyprinus carpio* Infected with *Aeromonas hydrophila* and Treated by *Alhagi maoururum* Powder.

Sarmad J. Jaleel Al-Saady Bashar Abdul-Hussain Al-Sa'adi

Sarmadj79@gmail.com com.bash2@atu.edu.iq

Animal Production Technology, Al-Musaib Technical College, Al-Furat Al-Awsat

Technical University, Babylon Province, Iraq

I.M Shnawa

College of Environmental Science , Al-Qasim Green University/ Babil / Iraq

ARTICLE INFO

Submission date: 6 / 1 / 2019

Acceptance date: 20 / 1 / 2019

Publication date: 1 / 11 / 2019

Abstract

The research was conducted to estimate the immune response of *cyprinus carpio* fishes which are infected with *A. hydrophila* and treated by *Alhagi* root powder, for this reason a total number of 60 fishes were used, those fishes were allotted on 6 treatments, The 1st treatment was given 2.5% of *Alhagi* root powder, The 2nd treatment was given 3.0% , The 3rd treatment was given 3.5% *Alhagi* root powder. Mean while the 4th treatment was given a control diet with out any supplement but fishes in this treatment were injected by *A. hydrophila* vaccine, the 5th treatment was given a control diet and injected by the normal saline. Moreover the 6th treatment was considered as a control treatment and fed on the control diet. Results showed a significant surpassing ($p < 0.05$) of total protein in fishes due to supplementing the powder of *Alhagi* root other treatments. Infection with *A. hydrophila* induced the highest secondary immune response. The war increase of Melano Macrophage Center in the spleen tissues due to supplementing the powder 3.5% of *Alhagi* root powder as compared to normal spleen . *Alhagi* root powder was shown to be expand the immune axis when compared to control.

Key word : *Aeromonas hydrophila*, *Alhagi maourur*, , *Cyprinus carpio*

دراسة الاستجابة المناعية لدى أسماك الكارب الاعتيادي *Cyprinus carpio* المخمجة ببكتريا *Aeromonas hydrophila* والمعالجة بمسحوق جذور نبات العاقول *Alhagi maoururm*.

سرمد جبار جليل بشار عبد الحسين السعدي

الكلية التقنية/المسيب , جامعة الفرات الاوسط التقنية

ابراهيم محمد سعيد شناوة

جامعة القاسم الخضراء

الخلاصة

أجري البحث لغرض تقدير الاستجابة المناعية لاسماك الكارب الاعتيادي المخمجة ببكتريا *Aeromonas hydrophila* والمعالجة بمسحوق جذور نبات العاقول ، ولهذا الغرض فقد استعمل بالبحث 60 سمكة كارب اعيادي ووزعت على ستة معاملات ، المعاملة الاولى اعطيت 2.5% غم من مسحوق جذور نبات العاقول و3.0% غم الى الحوض الثاني و3.5% للحوض الثالث اما الحوض الرابع فقد اعطيت الاسماك فيه على عليقة سيطرة بدون اضافات وحقنت باللقاح المميت لبكتريا الهايدروفيليا والحوض الخامس اعطيت الاسماك فيه على عليقة سيطرة بدون اضافات وحقنت بالماء الملح الوظيفي ، اما المعاملة السادسة عدت معاملة سيطرة بعد تغذيتها على عليقة السيطرة .

بينت نتائج البحث الى تفوق معنوي ($p < 0.05$) في مستوى البروتين الكلي من جراء اضافة مسحوق جذور نبات العاقول على باقي المعاملات وادى التخميج ببكتريا الهايدروفيليا الى اعلى استجابة مناعية ثانوية وكانت الاستجابة المناعية الثانوية في اعلى المستويات لدى استعمال مسحوق جذور نبات العاقول بنسبة 3.5% ليعيار تلازن 1280 وتم تشخيص البلاءم الكبيرة ذات الميلائين في المقاطع النسيجية للطحال عند استعمال مسحوق جذور نبات العاقول بكل التراكيز والبكتريا المقتولة بالحرارة والسيطرة ونستخلص من هذه الدراسة ان مسحوق جذور نبات العاقول بتركيز 3.5% له دور كبير في التحفيز المناعي مقارنة مع معاملة السيطرة.

الكلمات الدالة: البكتريا الهايدروفيليا, اسماك الكارب الاعتيادي , نبات العاقول

المقدمة

تُعد البيئة المائية المحيطة بالاسماك من اهم العوامل المؤثرة في نقل الكثير من الامراض للاسماك وتتأثر بالصفة الوبائية وتنتقل بين الانسان والحيوان كأمراض مشتركة [1]، وان بكتريا الهايدروفيليا هي من البكتريا الهوائية السالبة لصبغة غرام وتعزل في الكثير من الاحيان من المياه العذبة وهي شائعة الحدوث وترتبط مع مختلف الامراض التي تصيب الاسماك [2,3].

أشار العديد من الاطباء العرب لعلاج الكثير من الامراض وذلك باستعمال العديد من النباتات الطبية والتي استعملت أما عن طريق الفم بشكل مستخلصات نباتية أو استعمال كمراهم [4]. ويأتي من بين تلك النباتات نبات العاقول *Alhagimaoururm* والذي يعرف بأسم الحاج وهو عبارة عن نبات شوكي معمر يبدأ بالنمو في شهر نيسان من كل سنة وهو مرعى مفضل للابل ومن الفصيلة البقولية [5]. يحتوي نبات العاقول على مواد كربوهيدراتية وجلوكوسيداتوفلافونيدات ومواد عفصية وستيرولات غير مشبعة ومواد راتنجية وسكر مختزل وزيت طيار، والجذور لا تحتوي على أي نسبة من الزيوت الطيارة الا ان الجزء المستعمل منه يحتوي على جلوكوسيدات إنثراكينونية ومواد دباغية وراتنجاتوسيترولات غير مشبعة ومواد صابونية ومواد كربوهيدراتية [6]. يتميز النبات جميعه بتأثيرات حيوية مهمة إذ يعمل على زيادة قوة إنقباض القلب وهو منشط ويزيد سرعة

التنفس ولا يؤثر على درجة حرارة الجسم , فضلا عن انه مضاد للتقلصات وهو مفيد لعلاج نوبات الربو ومن خلال الخاصية الاخيرة والميزات لهذه النبتة أجريت هذه الدراسة لمعرفة مدى إمكانية استعمال نبات العاقول في محاولة التعرف على الاثر المحور للمناعة لمسحوق جذور نبات العاقول في رفع الكفاءة المناعية لسمك الكارب والاجهاد الذي تتعرض له الاسماك خلال فترة التربية.

تهدف هذه الدراسة الى التحري عن التحوير المناعي المحتمل لمسحوق جذور نبات العاقول باستخدام اسلوب التهيئة المسبقة لمادة الاختبار والتحدي بالمرض الحي في اسماك الكارب الاعتيادي.

المواد وطرق العمل

أجري البحث في مختبر الاسماك التابع الى قسم تقنيات الانتاج الحيواني في الكلية التقنية المسيب للمدة من 2018/9/12 الى 2018/11/12 . جُلبت اسماك التجربة البالغ عددها 60 سمكة من بحيرات الشرق الاوسط في الاسكندرية قضاء المسيب / محافظة بابل وتعود الى اسماك الكارب الاعتيادي وكانت اوزانها تتراوح بين 75 - 120 غم ووزعت على ستة معاملات بواقع 10 سمكات لكل حوض , المعاملة الاولى اعطيت 2.5% غم من مسحوق جذور نبات العاقول و3.0% غم الى الحوض الثاني و3.5% للحوض الثالث اما الحوض الرابع فقد اعطيت الاسماك فيه على عليقة سيطرة بدون اضافات وحقنت باللقاح المميت لبكتريا الهايدروفيليا والحوض الخامس اعطيت الاسماك فيه على عليقة سيطرة بدون اضافات وحقنت بالماء الملح الوظيفي, اما المعاملة السادسة عدت معاملة سيطرة بعد تغذيتها على عليقة السيطرة. ثم الحصول على بكتيريا الهايدروفيليا من اسماك مريضة جلبت من بحيرات مختلفة وعزلت وتمت تنميتها في المختبر باضافة مسحوق الحليب كبديل عن الكازالين والنشأ وماء الببتون ليكون وسط انتقائي لتنمية البكتريا المطلوبة وكما استخدمت اوساط زرعية اخرى وسط الماكونكي الصلب ووسط المغذي الصلب ووسط المغذي السائل ووسط نقيع القلب والدماغ السائل ووسط TCBS وذلك حسب ماذكره [7] وتم تشخيص البكتريا بالاستعانة بالاختبارات الكيمو حيوية مثل اختبار انزيم الاوكسيداز واختبار تخمر الكلوكوز واختبار احمر مثيل- فوكس بروسكار واختبار النمو واختبار الحركة واختبار تحلل الدم وحسب ماذكرها علاه.

وتم تحضير لقاح *A. hydrophila* المقتول بالحرارة حسب [8] وحددت الجرعة المميتة للقاح المميت لبكتريا الهايدروفيليا 10⁷ حسب [9]. وتم اجراء تالزن الشريحة والانبوب كمؤشر مناعي

تم اجراء تالزن الشريحة اولا لمعرفة المعاملات التي كان بها تحفيز مناعي وذلك باخذ المصل الكلي وبعد ذلك اجري تخفيف واحد الى خمس من المصل الى الماء الملح الوظيفي وملاحظة حدوث التالزن او عدم حدوثه وذلك بتقسيم الشريحة الى ثلاثة اقسام الاول المصل واللحاق والثاني المصل وماء الملح الوظيفي والثالث اللقاح وماء الملح الوظيفي , وبعد ان شخضت المعاملات والمراحل التي ظهر التالزن اجري عليها تالزن الانبوب.

1- توزيع 0.5 ml من ماء الملح الوظيفي على تسعة انابيب اختبار لكل معاملة ومكرراتها اما الاولى فوضع فيها 0.9 ml.

2- وضع 0.1 ml مصل للانبوب الاول (0.9 ml محلول فسلجي) وخلطت بالماصة الاوتوماتيكية لعدة مرات متتالية ثم نقل 0.5 ml منها الى الانبوب التالي وهكذا حتى الانبوب العاشر ونبذت الكمية الاخرى في المهملات.

3- ثم زيدت 0.5 ml من اللقاح البكتيري المقتول بالحرارة الى كل انبوب وبذلك كانت الكميات متساوية ولكن التخفيف كانت (1/10 و 1/20 و 1/40 و 1/80 و 1/160 و 1/320 و 1/640 و 1/1280.....الخ)

4- تركت بالحاضنة لمدة 24 ساعة على درجة حرارة 37 م وتمت القراءة.

وحللت نتائج البحث احصائيا باستعمال البرنامج الإحصائي SAS- Statistical Analysis System (2012) في تحليل البيانات لدراسة تأثير المعاملات المختلفة في الصفات المدروسة وفق تصميم عشوائي كامل (CRD) [10] وقورنت الفروق المعنوية بين المتوسطات باختبار Duncan (1955) متعدد الحدود [11].

النتائج والمناقشة

اشارت نتائج جدول (1): الى تأثير المعاملات المدروسة في مستوى البروتين الكلي (غم/ لتر).

المعاملة	المتوسط \pm الخطأ القياسي للبروتين	الحد الاعلى للبروتين	الحد الادنى للبروتين
ح1/2.5 % العاقول	2.17c \pm 33.8	48.3	20.7
ح2/3.0 % العاقول	2.25b \pm 36.7	45.0	24.8
ح3/3.5 % العاقول	4.52a \pm 48.5	84.1	29.0
ح4/السيطرة الموجبة /بكتريا	4.37b \pm 38.7	69.1	21.4
ح5/السيطرة السالبة /ماء الملح الوظيفي	1.38d \pm 27.8	32.0	20.1
ح6/السيطرة بدون اضافة	1.26d \pm 23.8	34.6	19.5
مستوى المعنوية	*	-	-
المتوسطات التي تحمل حروف مختلفة ضمن الصف الواحد تختلف معنويا فيما بينها. * (P<0.05).			

إن مؤشر البروتين الكلي في مصل الدم أعطى معدلات القيم للمعاملات ذات الاستجابة المناعية وكذلك السيطرة وكما يأتي:

سجلت المعاملة الاولى في جذور نبات العاقول ذات التركيز 2.5% معدل البروتين خلال المدة المحددة من شهر أيلول 2018 الى شهر تشرين الثاني 2018 هو (33.8) غم/ لتر وكان الحد الادنى هو (20.7) غم/لتر والحد الاعلى هو (48.3) غم /لتر , اما المعاملة الثانية ذات التركيز 3.0% خلال المدة المذكورة نفسها هو (36.7) غم/لتر والحد الادنى هو (24.8) غم / لتر اما الحد الاعلى كان (45.0) غم/لتر والمعاملة الثالثة ذات التركيز 3.5% كان المعدل هو (48.5) غم / لتر والحد الادنى هو (29.0) غم /لتر والحد الاعلى هو (84.1) غم/لتر. وكان معاملة البكتريا المقتولة بالحرارة معدل البروتين فيها هو (38.7) غم/لتر والحد الادنى كان (21.4) غم /لتر والحد الاعلى كان (69.1) غم /لتر , ومعاملة ماء الوظيفي كان معدل البروتين هو (27.8) غم/لتر والحد الادنى هو (20.1) غم/لتر والمعدل الاعلى كان (32.0) غم/لتر , اما السيطرة كان معدل البروتين فيه هو (23.8) غم/لتر والحد الادنى كان (19.5) غم/لتر والحد الاعلى كان (34.6) غم/ لتر . كما تفوقت معاملة

الحوض الثالث ذات التركيز 3.5% من مادة العاقول على الجميع فقط في الحد الاعلى والحد الادنى كما موضح في جدول (1) وحللت البيانات بطريقة التصميم العشوائي الكامل CRD (10) وجد ان هناك فروق معنوية على مستوى معنوية (P<0.05) . كما اوضح (11).

اوضحت نتائج فحص التلازن في الانبوبة للبكتريا *A. hydrophila* المعامل بالحرارة جدول(2) مع امصال الاسماك الممنعة بهذا البكتريا وسيطرة ماء الملح الوظيفي اذ بين عيار الاجسام المضادة بالبكتريا في الاستجابة المناعية الثانوية اعلى من الاستجابة المناعية الاولى ولم تحصل استجابة مناعية اولية في البكتريا المقتول بالحرارة و سيطرة الماء الوظيفي والسيطرة .

جدول(2) : الى الاستجابة المناعية للـ *A. hydrophila* لمعاملة البكتريا .

ت	الاستجابة المناعية	المعيار
1	الاستجابة الاولى	320
2	الاستجابة الثانوية	640
3	بعد الاستجابة الاولى والثانوية اليوم 60	20
4	سيطرة ماء الملح الوظيفي	0

من خلال جدول(3) يلحظ ان جذور نبات العاقول محفز مناعي غير متخصص في الاحواض الثلاثة الاولى بمختلف تراكيزها , واللقاح بمفرده قد عزز اثره بالتحدي الاول والتحدي الثاني في الحوض الرابع حوض البكتريا المقتولة , ومعاملة التحدي غير الملقحة كان التحدي الاول قد عزز التحدي الثاني , والوفيات كانت في حوض الخامس حوض الماء الوظيفي , اللقاح الحي الاول به ادى الى فعل امراضي في معظم اسماك التجربة وقليل منها ادى الى فعل امراضي ووفيات , مما يدل على ان اللقاح الحي والميت ادى الى مناعة خلطية غير موافقة للوقاية المناعية.

جدول (3) الاستجابة المناعية للـ *A. hydrophila* لمعاملة جذور نبات العاقول

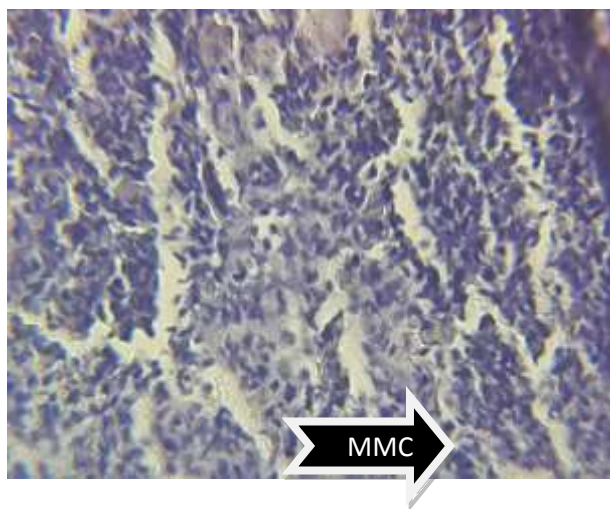
ت	الاستجابة المناعية لكل تركيز	العيار
1	الاستجابة الاولى 25%	640
	الاستجابة الاولى 30%	320
	الاستجابة الاولى 35%	320
2	الاستجابة الثانوية 25%	640
	الاستجابة الثانوية 30%	320
	الاستجابة الثانوية 35%	1280
3	الاستجابة الاولى للماء الوظيفي	0
	الاستجابة الثانوية للماء الوظيفي بعد التحدي الثاني	1280
4	الاستجابة المناعية للسيطرة	0

الدراسة النسيجية

نسيج الطحال:

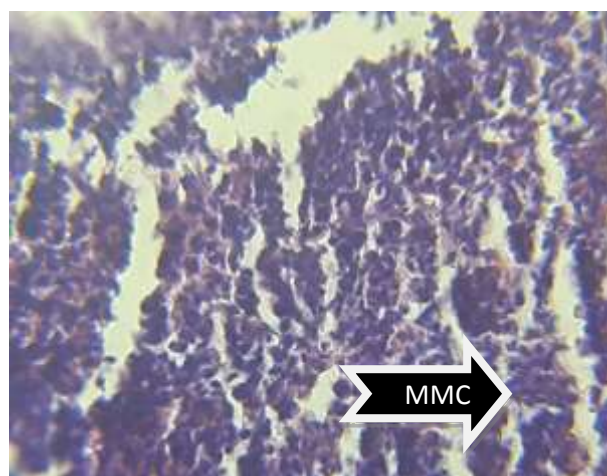
تم فحص الشرائح المصبوغة بصبغة هيماتوكسيليناايوسين والخاص بنسيج الطحال لكل من السيطرة السالبة والموجبة والمعاملات الثلاث المختلفة ، اظهرت مقاطع السيطرة السالبة المحضرة من طحال الاسماك المرباة ومحقونة بماء الملح الوظيفي ان الطحال مكون من لب ابيض ولب احمر. تبين ان اللب الابيض يحوي مجتمعات من خلايا لمفية يتخللها مجموعة من البلاعم الكبيرة ذات الميلانين Melano Macrophage Centers مع غياب نسيج المحفظة المميز لطحال الاسماكوالحويجزات العضلية Tracublae كانت الخلايا اللمفية في اللب الاحمر اقل منها في اللب الابيض. بينت نتائج المقاطع النسيجية للطحال (المأخوذة من الاسماك المنعقة باللقاح الحي للبكتريا *A. hydrophila* والمهياة مسبقا بالمحفزات المناعية مسحوق جذور نبات العاقول وبنسب مختلفة) وجود زيادة في كثافة مجتمعات الخلايا اللمفية Lymphocyte density في اللب الابيض (white pulp) مقارنة بالسيطرة وفرط الانقسام proliferative responses لمراكز البلاعم الكبيرة ذات الميلانين MMC ودرجات متفاوتة طبقا لطبيعة المحفز المناعي وافضل تجاوب لفرط انقسام MMC كان في

الحوض الثالث ذات التركيز 3.5% غم وبكتريا مقتولة وبدرجة اقل كان في التركيز 2.5% غم. وهذه النتيجة تعزز دوره بوصفه محور مناعي في سمك الكاربيا سلوب التهيئة المسبقة والجرعة 3.5% تعد المثلى لهذا الفعل اذ ماقورنت بالعاريات المرتفعة للضد المتخصص بالمسبب في هذه المعاملة.



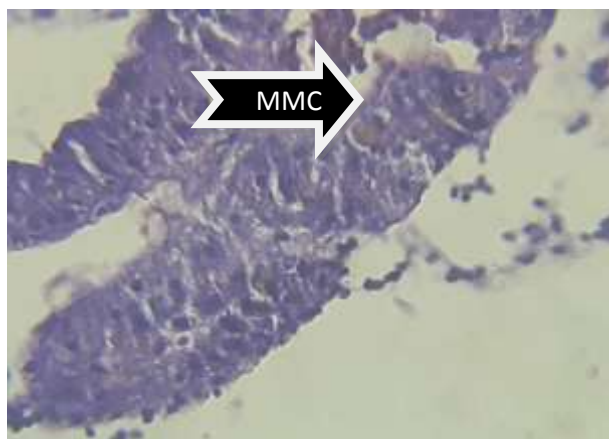
شكل (2)

مقطع نسيجي في طحال سمكة معاملة بالعاقول 5,2%



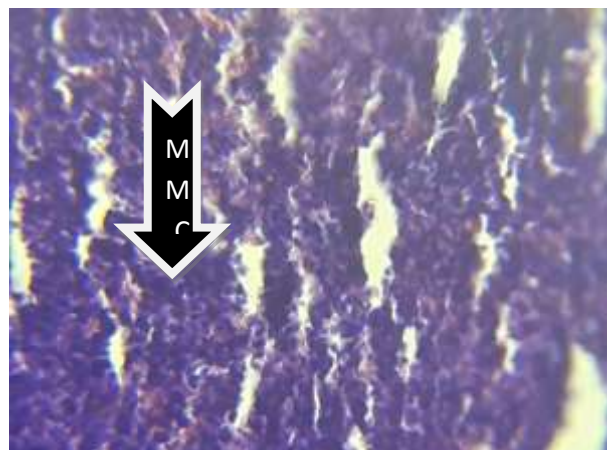
شكل (1)

مقطع نسيجي في طحال سمكة معاملة بالعاقول 3 %



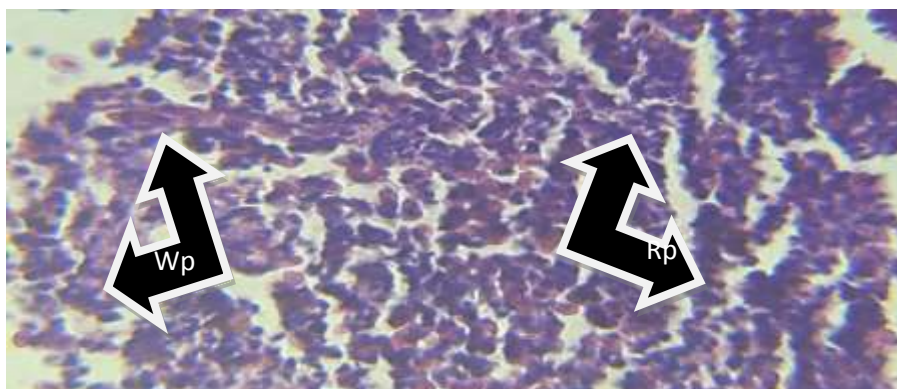
شكل (4)

مقطع نسيجي في طحال سمكة معاملة بالعاقول 3,5%



شكل (3)

مقطع نسيجي في طحال سمكة معاملة بالبكتيريا
المقتولة بالحرارة



شكل (5) مقطع نسيجي في طحال سمكة معاملة السيطرة السالبة من دون زيادات : Wp: اللب الابيض،
Rp: اللب الاحمر

كما بينت نتائج جدول(4) الى معدلات مؤشر الطحال لاسماك التجربة للمعاملات ذات الاستجابة المناعية.

كان معدل وزن الطحال للحوض الاول ذات النسبة 2.5% غم هو 0.51 غم والحوض الثاني ذات النسبة 3.0 % غم هو 0.46 غم , ومعدل وزن الطحال للحوض الثالث ذات النسبة 3.5% غم هو 0.42 غم وان معدل وزن الطحال للحوض الرابع ذات البكتريا المقتولة بالحرارة كان 0.56 غم ومعدل وزن الطحال للحوض الخامس ماء الملح الوظيفي كان 0.42 غم ,بينما كان حوض السيطرة معدلة 0.56 غم ومؤشر الطحال للمعاملات المختلفة في نهاية التجربة والسيطرة العامة كانت قيمتها (0.00464) وعند تطبيق المعادلة لمعرفة مؤشر الطحال كانت النتيجة لمعاملات العاقول بالنسب المختلفة بالحوض الاول كان 1.12 غم والحوض الثاني هو 1.34 غم والحوض الثالث كان 1.09 غم وحوض البكتريا المقتولة بالحرارة كان مؤشر الطحال هو 1.34 غم وحوض الماء الوظيفي كان مؤشر الطحال به 1.04 غم كما مبين في جدول (4).

جدول(4) الى معدلات مؤشر الطحال لاسماك التجربة للمعاملات ذات الاستجابة المناعية

تسلسل الاحواض	وزن السمكة / 1 غم	وزن الطحال/بالغرام	وزن السمكة 2/غم	وزن الطحال/غم	معدل وزن الطحال/ غم	مؤشر الطحال /بالغرام
ح1/ 2.5% مادة العاقول	101	0.28	93	0.23	0.51	1.12
ح2/ 3.0% مادة العاقول	74	0.26	73	0.20	0.46	1.34
ح3/ 3.5% مادة العاقول	90	0.23	75	0.19	0.42	1.09
ح4/ بكتريا مقتولة	72	0.26	108	0.30	0.56	1.34
ح5/ ماء الملح الوظيفي	78	0.19	96	0.23	0.42	1.04
ح6 /السيطرة/0%	97	0.21	143	0.35	0.56	1.00

Conflict of Interests.

There are non-conflicts of interest .

المصادر

- 1- المنظمة العربية للتنمية الزراعية (2013) . دراسة حول امراض الأسماك في الوطن العربي. جمهورية مصر العربية، 210 صفحة.
- 2-Janda, J. M. 2001. Aeromonas and Plesiomonas. In: M. Sussman (ed.), Molecular medical microbiology, Academic Press, London, England. pp. 1237-1270
- 3-Shome, R. B., R. Shome, Y. Mazumder, A. Das, A. Kumar, H. Rahman and K. M. Bujarbaruah. 2005. Abdominal dropsy disease in major caps of Meghalaya: Isolation and characterization of Aeromonas hydrophila. Curr. Sc. 88(12):1897-1900.
- 4-Bedevian, A.K. (2006) .Polyglottic dictionary of plant names in Latin , Arabic , Armenian , English , French , German , Italian and Turkish languages including

economic , medicinal , Poisonous and ornamental plants and common weeds.
Medboul Library, Cairo:644pp.

- 5-Chittendon. (1951)** RHS Dictionary of Plants plus Supplement 1956 Oxford University Press Comprehensive listing of species and how to grow them. Somewhat outdated, it has been replaced in 1992 by a new dictionary (2000).
- 6-Tanaka, T.(1976)** Tanaka's Cyclopaedia of Edible Plants of the World. Keigaku Publish The most comprehensive guide to edible plants I've come across
- 7-Harley, J. P. and Prescott, L. M. (2002).** Laboratory exercises in Microbiology, 5th edn. IV. Biochemical activities of bacteria 32. proteins, amino acids and enzymes IX: Lysine and ornithine decarboxylase test. The McGraw-Hill Companies: 466 pp.
- 8- Stevens, C. D. (2010).** Clinical immunology and serology. A laboratory perspective 3th ed. Western Carolina University, 144 pp.
- 9- Melnick, J. and Adelberg (2007).** Lange medical microbiology.24th Ed. Cop. The McGraw-Hill comp. Seafdec/AQD Institutional Repository (SAIR), 818 pp. **10-SAS. 2012.** Statistical Analysis System, User's Guide. Statistical. Version 9.1th ed. SAS. Inst. Inc. Cary. N.C. USA.
- 11-Duncan, D.B. 1955.** Multiple Rang and Multiple F-test. Biometrics. 11:4-42.